

РАЗЛИЧНАЯ РЕАКЦИЯ КОРОВЫХ ГИСТОНОВ H2A И H2B НА ВОЗДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО ЛАЗЕРА

Г.Е. Бриль — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, профессор кафедры патологической физиологии, профессор, доктор медицинских наук; **А.В. Егорова** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры гистологии, кандидат медицинских наук; **И.О. Бугаева** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой гистологии, профессор, доктор медицинских наук; **О.В. Ушакова** — ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет им. Гагарина Ю.А.», доцент кафедры радиозлектроники и телекоммуникации, доцент, кандидат физико-математических наук; **О.Л. Матюшкина** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, ассистент кафедры гистологии.

DIFFERENT REACTION OF CORE HISTONES H2A AND H2B TO THE RED LASER RADIATION

G. E. Brill — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Pathological Physiology, Professor, Doctor of Medical Sciences; **A. V. Egorova** — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Histology, Assistant Professor, Candidate of Medical Sciences; **I. O. Bugaeva** — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Head of Department of Histology, Professor, Doctor of Medical Sciences; **O. V. Ushakova** — Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, Department of Radio Electronics and Telecommunications, Assistant Professor, Candidate of Physical and Mathematical Sciences; **O. L. Matyushkina** — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Histology, Assistant.

Дата поступления — 15.05.2017 г.

Дата принятия в печать — 12.09.2017 г.

Бриль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., Ушакова О.В., Матюшкина О.Л. Различная реакция коровых гистонов H2A и H2B на воздействие красного лазера. Саратовский научно-медицинский журнал 2017; 13 (3): 469–472.

Цель: изучить влияние лазерного излучения красной области спектра на процесс структурообразования коровых гистонов H2A и H2B. **Материал и методы.** В работе использовались растворы гистоновых белков человека. Структурообразование изучалось методом клиновидной дегидратации. Имидж-анализ фаций заключался в их качественной характеристике и расчете, с последующей статистической обработкой количественных показателей. **Результаты.** В ходе эксперимента выявлено существенное модифицирующее влияние на процесс структурообразования корового гистона H2B при воздействии линейно-поляризованного лазерного излучения красной области спектра ($\lambda=660$ нм, 1 Дж/см²), в то время как самоорганизация гистона H2A изменяется незначительно. **Заключение.** Существует дифференциальная чувствительность различных классов гистонов к лазерному воздействию. Поскольку гистоновые белки, использованные в экспериментах, присутствуют в виде водно-солевых растворов, наблюдаемый эффект красного излучения реализуется, по-видимому, за счет образования синглетного кислорода в результате прямого лазерного возбуждения молекулярного кислорода.

Ключевые слова: коровые гистоны, структурообразование, лазерное излучение.

Brill GE, Egorova AV, Bugaeva IO, Ushakova OV, Matyushkina OL. Different reaction of core histones H2A and H2B to the red laser radiation. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2017; 13 (3): 469–472.

Aim: to investigate the influence of red laser irradiation on the processes of self-assembly of core histones H2A and H2B. **Material and Methods.** Solutions of human histone proteins were used in the work. Self-assembly was studied by the method of wedge dehydration. Image facies analysis consisted in their qualitative characterization and calculation of quantitative indicators with subsequent statistical processing. **Results.** It was established that linearly polarized laser light of the red region of the spectrum ($\lambda=660$ nm, 1 J/cm²) significantly modifies the process of self-assembly of core histone H2B, while the structure of the facies of H2A histone changing to a lesser extent. **Conclusion.** Red laser radiation influences on the on the processes of self-assembly of core histones H2A and H2B. There is a differential sensitivity of different classes of histones to laser action. Histone proteins used in the experiments are present in the form of aqueous salt solutions. Red light realizes the effect seems to be due to the formation of singlet oxygen by direct laser excitation of molecular oxygen.

Key words: core histones, self-organization, red laser radiation.

Введение. Гистоны — белки, входящие в состав хроматина, выполняют в ядре две основные функции: участвуют в упаковке нитей ДНК и осуществляют эпигенетическую регуляцию процессов транскрипции, репликации и репарации. Гистоны H2A, H2B, H3, H4 называются коровыми и формируют нуклеосому. Она представляет собой белковую глобулу, на которую накручена нить ДНК. В пространственной структуре отдельного гистона различают глобулярное ядро, осуществляющее димеризацию, и неструктурированный N-концевой домен, определяющий стабильность нуклеосомы [1]. Особенностью N-концевых доменов является их возможность подвергаться большому числу химических модификаций: ацетилрованию, метилированию, убиквитинированию, фосфорилированию, АДФ-рибозилированию, сумоилированию, изомеризации и деиминированию пролина [2–4], которое приводит к изменению активности определенных локусов ДНК. При этом концевые участки гистонов одновременно изменяются по нескольким аминокислотным остаткам [5, 6]. Такое разнообразие модификаций позволяет думать о наличии уникального гистонного кода, который определяет не только степень конденсации хроматина, но и уровень экспрессии генов [7, 8]. Вместе с тем существует предположение, что не только химическая модификация, но и действие физических факторов, в частности электромагнитных полей, может оказывать модифицирующее влияние на функцию гистонов [9]. Первичная структура гистонов предопределяет конформационную подвижность их молекул, благодаря которой при образовании генетических структур молекулы гистонов подвергаются самосборке (self-assembly) [4]. Однако до настоящего времени механизм самоорганизации гистоновых белков и влияющие физические факторы на этот процесс исследованы недостаточно.

Цель: изучение влияния линейно-поляризованного лазерного излучения красной области спектра ($\lambda=660$ нм, 1 Дж/см²) на процесс дегидратационной самоорганизации коровых гистонов H2A и H2B.

Материал и методы. Для исследования использовались рекомбинантные гистоны человека H2A и H2B, полученные из лаборатории New England Biolabs (США). Гистоны в концентрации 1 мг/мл находились в следующих средах: гистон H2A — 20 мМ натрия фосфат, 300 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА; среда гистона H2B содержала еще 1 мМ дитиотрейтола; pH $7,0$ при 25°C .

Для изучения процесса структурообразования гистонов использовался метод клиновидной дегидратации [10]. На чистое, сухое, обезжиренное предметное стекло помещался 1 мкл исследуемого гистона (контрольная проба). Далее в течение 10 мин при комнатной температуре (20°C) стекло с препаратом сохранялось в строго горизонтальном положении. В отдельных сериях опытов растворы гистонов предварительно облучали линейно-поляризованным светом красного лазера ($\lambda=660$ нм, 1 Дж/см²). Обычно наносились 8 капель для сравнительного анализа.

После высушивания препараты подвергались световой микроскопии (Zeiss, Germany) с фоторегистацией структурного следа и сохранением информации в файле компьютера. Имидж-анализ фаций включал их качественную характеристику, а также расчет ко-

личественных показателей с последующей статистической обработкой.

При обработке фаций использовалась специальная компьютерная программа, рассчитывающая такие параметры, как S_1 — площадь периферического ободка, нормированная на общую площадь фации; S_2 — площадь центральной зоны, нормированная на общую площадь фации. В центральной зоне фации определялись: Nob — количество гребешков в типичном фрагменте фации; average size (AS) — средний размер гребешков в типичном фрагменте фации; $Dcorr$ — корреляционная размерность типичного фрагмента; $Entr$ — неоднородность поверхности фации в типичном фрагменте. Количественные параметры обрабатывались статистически с использованием пакета программ Prism-4. Для выбора адекватного способа представления полученных экспериментальных данных проводили проверку нормальности распределения количественных признаков (показателей) в выборках и применяли для этого критерий Шапиро — Уилка. Большинство наших данных соответствовало закону нормального распределения, поэтому для описания количественных признаков в выборочной совокупности использовали выборочное среднее M , стандартную ошибку выборочной оценки среднего m и выборочное стандартное отклонение s . Для оценки статистической значимости различий двух сравниваемых групп применяли критерий Стьюдента. Различия средних считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Фации гистона H2A в контроле (без облучения) имели округлую форму с четко определяющимся бесструктурным светлым ободком. Вся поверхность фации вне ободка отличалась наличием фона, представленного сложным переплетением дендритно-осевых элементов с линейной направляющей (осевой) ветвью и отходящими от нее под прямым углом мелкими боковыми ветвями. Некоторые элементы имели концевые булавовидные расширения. На этом фоне встречались единичные крупные кристаллы неправильной, ромбовидной и прямолинейной формы с оранжевым центром.

Воздействие на раствор гистона H2A линейно-поляризованным лазерным светом не приводило к заметным качественным изменениям получаемого структурного следа. Количественный анализ параметров облученных фаций также не позволил выявить достоверные различия с контролем ни по одному из показателей (табл. 1).

Фации гистона H2B в контроле (без облучения) имели округлую форму с четко определяющимся бесструктурным ободком. Центральная часть структурного следа отличалась наличием «фона», представленного дендритно-осевыми элементами с линейной направляющей ветвью и отходящими от нее под прямым углом боковыми ветвями. Некоторые элементы имели концевые булавовидные расширения. На этом «фоне» по всей площади фации были несимметрично разбросаны крупные, преимущественно прямолинейные «стреловидные» кристаллы, среди которых встречались кристаллы неправильной и ромбовидной формы.

Облучение линейно-поляризованным лазерным светом ($\lambda=660$ нм, 1 Дж/см²) значительно модифицировало процесс клиновидной дегидратации раствора гистона H2B. Сохранялся ободок и структура «фона» центральной зоны фации. Однако в центральной зоне происходила деструктуризация «стреловидных» кристаллов. Их заменили множественные пря-

Таблица 1

Количественные параметры фаций, полученных при клиновидной дегидратации раствора гистона H2A в контроле и после облучения светом красного лазера

Показатели	Контроль	Лазер
S ₁	n=8 0,12±0,007	n=8 0,13±0,01 p>0,5
S ₂	n=8 0,87±0,007	n=8 0,87±0,001 p>0,5
Центральная зона		
N об.	n=6 72,2±8,8	n=6 70,3±5,9 p>0,5
Aver. size	n=6 78,1±11,1	n=6 74,1±2,5 p>0,5
Entr.	n=6 0,66±0,04	n=6 0,56±0,05 p>0,2
Dcorr.	n=6 1,869±0,01	n=6 1,819±0,03 p>0,2

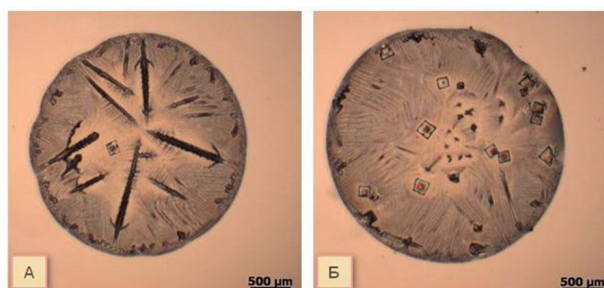
Примечание: p — достоверность различий с контролем.

Таблица 2

Количественные параметры фаций, полученных при клиновидной дегидратации раствора гистона H2B в контроле и после облучения светом красного лазера

Показатели	Контроль	Лазер
S ₁	n=8 0,128±0,007	n=8 0,091±0,170 p>0,5
S ₂	n=8 0,86±0,007	n=8 0,89±0,008 p<0,05
Центральная зона		
N об.	n=6 178,8±3,8	n=6 135,3±9,4 p<0,05
Average size	n=6 43,5±5,7	n=6 44,2±3,6 p>0,5
Entr.	n=6 0,53±0,06	n=6 0,63±0,03 p>0,2
Dcorr.	n=6 1,701±0,04	n=6 0,632±0,04 p<0,001

Примечание: p — достоверность различий с контролем.



Общий вид фации, получаемой при дегидратационной самоорганизации гистона H2B: А — в контроле (x4); Б — после облучения лазером (x4)

моугольные кристаллы с оранжевым центром и кристаллы небольшого размера неправильной формы (рисунок).

Результаты количественной обработки фаций, получаемых при клиновидной дегидратации раствора гистона H2B в контроле и после лазерного облучения, представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, фации контрольных и облученных образцов гистона H2B отличались по ряду параметров. Облучение раствора гистона линейно-поляризованным светом красного лазера привело к увеличению площади центральной зоны фации ($p<0,05$). Отмечалось уменьшение количества гребешковых объектов в данной области в 1,3 раза ($p<0,05$). Воздействие лазерного света значительно уменьшало и степень структурированности (корреляционной размерности) центральной зоны фации ($p<0,001$).

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что линейно-поляризованное лазерное излучение красной области спектра ($\lambda=660$ нм, 1 Дж/см²) оказывает существенное модифицирующее влияние на структурообразовательные свойства корового гистона H2B, в то время как структура фаций гистона H2A остается неизменной. Следует учесть, что гистоны, использованные в наших экспериментах,

присутствуют в виде водно-солевого раствора. Красное излучение реализует свой эффект, по-видимому, за счет образования синглетного кислорода в результате прямого лазерного возбуждения молекулярного кислорода. Синглетный кислород является сигнальным фактором, запускающим каскад структурных перестроек в водной среде. В этих условиях изменяются гидратационные свойства водных молекул, что может отразиться на поведении корового гистона H2B в процессе структурообразования.

Закключение. Лазерное излучение красного диапазона спектра оказывает влияние на структурообразование гистонов. Существует дифференциальная чувствительность различных классов гистонов к лазерному воздействию.

Конфликт интересов: конфликт интересов не заявляется.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования, получение данных, анализ данных, интерпретация результатов — Г.Е. Брилли, А.В. Егорова, И.О. Бугаева, О.В. Ушакова; написание статьи — А.В. Егорова, О.В. Ушакова, О.Л. Матюшкина; утверждение рукописи для публикации — И.О. Бугаева.

References (Литература)

- Hayes JJ, Clark DJ, Wolffe AP. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88 (15): 6829–6833.
- An W. Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. Subcell Biochem 2007; 41: 351–369.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Research 2011; 21: 381–395.
- Suganuma T, Workman JL. Signal and combinatorial functions of histone modifications. Annu Rev Biochem 2011; 80: 473–499.
- Barski A, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 2007; 129 (4): 823–837.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007; 128 (4): 693–705.
- Jenuwein TC, Allis D. Translating the histone code. Science 2001; 293 (5532): 1074–1080.

8. Turner BM. Cellular memory and the histone code. Cell 2002; 111 (3): 285–291.

9. Brill GE, Egorova AV, Dubovitskiy VA, Vlaskin SV. Gistony — vozmozhnye triggery vliyaniya elektromagnitnykh izlucheniya na kletochnyy genom. In: Primenenie lazerov v meditsine i biologii: Mater. XXXVIII Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Yalta, 2012; p. 97–98. Russian (Брилль Г.Е., Егорова А.В., Дубовицкий В.А., Власкин С. В. Гистоны — воз-

можные триггеры влияния электромагнитных излучений на клеточный геном. В сб.: Применение лазеров в медицине и биологии: Материалы XXXVIII Международной научно-практической конференции. Ялта, 2012; с. 97–98).

10. Shabalin VN, Shatokhina SN. Morphology of human biological fluids. M.: Khristostom, 2001; 303 p. Russian (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001; 303 с.).

УДК 579.841.11:159.944]:616–092.9

Оригинальная статья

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОТОКСИНА A PSEUDOMONAS AERUGINOSA НА ПОКАЗАТЕЛИ РАБОТОСПОСОБНОСТИ БЕЛЫХ КРЫС

В.В. Моррисон — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, профессор кафедры патологической физиологии им. А.А. Богомольца, профессор, доктор медицинских наук; **В.И. Попович** — 33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт (ЦНИИИ) МО России, начальник отдела, кандидат медицинских наук; **В.О. Васютина** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, студент; **А.В. Моррисон** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры кожных и венерических болезней, кандидат медицинских наук.

EXOTOXIN A PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFLUENCE ON WORKING EFFICIENCY OF WHITE RATS

V.V. Morrison — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Pathological Physiology, Professor, Doctor of Medical Science; **V.I. Popovich** — Central Scientific Research Experimental Institute 33, Head of Department, Candidate of Medical Science; **V.O. Vasyutina** — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Medical Faculty, Student; **A.V. Morrison** — Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Skin and Venereal Diseases, Candidate of Medical Science.

Дата поступления — 26.06.2017 г.

Дата принятия в печать — 12.09.2017 г.

Моррисон В.В., Попович В.И., Васютина В.О., Моррисон А.В. Влияние экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* на показатели работоспособности белых крыс. Саратовский научно-медицинский журнал 2017; 13 (3): 472–474.

Цель: изучение влияния экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* (ЭТ-А) на показатели физической и умственной работоспособности белых крыс. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на белых крысах после внутрибрюшинного введения различных доз (0,1, 0,5 и 1,0 LD₅₀) синегнойного экзотоксина А. Изучали показатели умственной и физической работоспособности белых крыс по методике «камера Махта». **Результаты.** Даже при введении ЭТ-А в дозе 1 LD₅₀ нарушение условно-рефлекторной реакции регистрируется только у 20% животных. Количество случаев физической неадекватности при введении высокоэффективных доз ЭТ-А достоверно превышает количество случаев срыва условно-рефлекторного компонента реакции избегания и составляет 44%. **Заключение.** Синегнойный экзотоксин А не проявляет избирательного действия на высшую нервную деятельность и оказывает незначительное влияние на физическую работоспособность белых крыс.

Ключевые слова: экзотоксин А, умственная и физическая работоспособность.

Morrison VV, Popovich VI, Vasyutina VO, Morrison AV. Exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa* influence on working efficiency of white rats. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2017; 13 (3): 472–474.

Objective: to study exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa* influence on physical and mental efficiency of white rats. **Material and Methods.** The experiments were carried out on white rats following intraperitoneal injections of exotoxin A *Pseudomonas* of different doses (0.1, 0.5 and 1.0 LD₅₀). Physical and mental efficiency of white rats was determined by the scheme of “Macht’s camera”. **Results.** Introducing exotoxin A *Pseudomonas* of 1 LD₅₀ there was conditioned response damage in 20% of animals. The amount of cases of physical incapacity introducing highly effective doses of exotoxin A *Pseudomonas* overcomes the amount of cases of reaction destruction (44%). **Conclusion.** Exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa* does not reveal a selective effect on the central nervous system and significant influence on physical efficiency of white rats.

Key words: exotoxin A, physical and mental efficiency.

Введение. Синегнойная палочка — распространенная грамотрицательная аэробная бактерия, являющаяся оппортунистическим патогеном человека и животных. Возрастающая роль синегнойной палочки как возбудителя госпитальных инфекций определяется не только достаточно высокой частотой ее распространения, но и тяжестью течения вызываемых ею заболеваний, трудностями в терапии вследствие низкой ее чувствительности к большинству антибио-

тиков. *Pseudomonas aeruginosa* в ожоговых, онкологических, урологических стационарах нередко преобладает над грамположительными кокками [1–4].

Одним из наиболее значимых факторов патогенности *P. aeruginosa* является экзотоксин А (ЭТ-А), вызывающий системные и местные проявления инфекции.

Установлено, что ЭТ-А обладает выраженными гепатотоксическим, иммунотоксическим, гематотоксическим эффектами [3, 5, 6].

Поражение нервной системы является одним из самых тяжелых проявлений синегнойной инфекции. Клиническими формами поражения нервной системы является менингит и менингоэнцефалит [1, 7].

Ответственный автор — Моррисон Виталий Викторович
Тел.: 8-927-148-44-94
E-mail: morrison@sgmu.ru